Original Article

ผลของระยะเวลาในการแช่น้ำและอุณหภูมิการแช่น้ำต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

Effects of Soaking Time and Soaking Temperature on the Isoflavone Content in Soybean

จารุวรรณ ธนวิรุฬห์[1]
Charuwan Thanawiroon[*1]

[1]กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
Received: 14 November 2007 Accepted: 13 February 2008

Abstract

Isoflavones are widely used as an alternative treatment to hormone replacement therapy and also for prevention of several chronic diseases, including cancers. Isoflavones in soybeans may present different isoflavone profiles and contents depending on several factors such as strain variety, harvest conditions, storage duration, including processing conditions. However, genistein is the most abundant isoflavone aglycone found in soy extracts, where it also occurs as glycoside, genistin. This paper describes the validation of a gradient reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method for the analysis genistin and genistein resulting from change in soaking time and temperature. Results showed that the concentration of aglycone, genistein, increased with increasing soaking time and temperature, while a reversed trend was found for the other glycoside, genistin. Soaking temperature at 25°C and 60°C caused the hydrolysis of glycoside by different activities. Hydrolysis of glycoside at room temperature caused by endogenous β-glucosidase activity, while that at 60°C caused by high temperature. In addition, soaking temperature seemed to show a greater impact on the yield of aglycone than soaking time.

Keywords: Isoflavones, Soaking time, Soaking temperature, HPLC

*ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้: จารุวรรณ ธนวิรุฬห์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โทรศัพท์ 045-353616 โทรสาร 045-288384,
email: charuwan9@yahoo.com

บทคัดย่อ

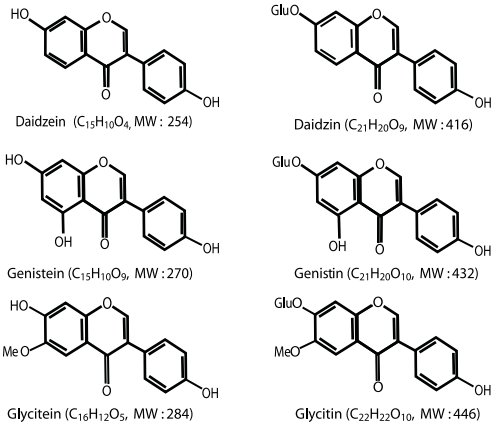
ไอโซฟลาโวนถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเป็นฮอร์โมนทดแทน และมีข้อแนะนำใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังหลายชนิดรวมทั้งโรคมะเร็ง ไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองมีสัดส่วนและปริมาณของสารไอโซฟลาโวนแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุ์พืช สภาวะการปลูก ระยะการเก็บรวมถึงขั้นตอนการแปรรูป สารเจนิสเตอีนเป็นไอโซฟลาโวนชนิดอะกลัยโคนที่พบมากที่สุดในสารสกัดถั่วเหลือง ซึ่งสารนี้สามารถอยู่ในรูปของกลัยโคไซด์ คือ เจนิสตินด้วย งานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ RP-HPLC ซึ่งใช้ระบบเกรเดียนในการหาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสตินในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆ จากการทดลองพบว่าปริมาณเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำที่เพิ่มขึ้นและอุณหภูมิการแช่น้ำที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณของเจนิสตินลดลง พบว่าปริมาณเจนิสเตอีนที่เพิ่มขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 25 ˚C เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลัยโคซิเดสที่เปลือกด้านในของเมล็ด ในขณะที่ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ 60 ˚C เกิดจากการทำลายพันธะกลัยโคซิดิคด้วยความร้อน พบว่าปัจจัยด้านอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณอะกลัยโคนมากกว่าปัจจัยด้านระยะเวลาการแช่น้ำ

คำสำคัญ: ไอโซฟลาโวน ระยะเวลาแช่น้ำ อุณหภูมิการแช่น้ำ HPLC

บทนำ

การวิจัยและพัฒนาสารจากธรรมชาติที่มีประโยชน์ในการป้องกันและสร้างเสริมสุขภาพเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน นอกเหนือจากพืชสมุนไพรแล้ว พืชซึ่งนิยมใช้รับประทานเป็นอาหารหลายชนิดก็มีคุณประโยชน์ทางการแพทย์ที่น่าสนใจเช่นกัน พืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะถั่วเหลือง จัดเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูงประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 30-50 พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ และยังป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของ LDL โคเลสเตอรอล ที่เป็นสาเหตุของการทำให้ผนังเส้นเลือดแดงเป็นแผ่นหนา ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากโปรตีนแล้ว ถั่วเหลืองยังประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ คือ ไอโซ-ฟลาโวน กรดไฟติค ซาโปนิน และโอลิโกแซคคาไรด์ ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง ได้แก่ เจนิสติน เดดซีน เจนิสเตอีน และเดดเซอีน จัดเป็นกลุ่มสารที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาการนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตขึ้นได้ในร่างกายและมีฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง จึงเรียกสารที่มีคุณสมบัตินี้ว่า ไฟโตเอสโตรเจน จากข้อมูลการศึกษาวิจัยจำนวนมากพบว่า ไฟโตเอสโตรเจนอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการใช้ทดแทนการขาดฮอร์โมนเพศและป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดในสตรีวัยทองได้ นอกจากนี้ไฟโตเอสโตรเจนยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส เป็นต้น สารกลุ่มไอโซฟลาโวนที่พบมากในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยสารกลุ่มที่มีน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่า สารกลุ่มกลัยโคไซด์ ได้แก่ เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่มกลัยโคไซด์นี้ละลายในน้ำได้ดี ดังนั้นจะสูญเสียไปในระหว่างการแปรรูปถั่วเหลืองได้ มีการคาดประมาณว่า สารในกลุ่มนี้จะสูญเสียไปถึงร้อยละ 50 ในระหว่างการทำเต้าหู้ สารในกลุ่มกลัยโคไซด์นี้เมื่อถูกรับประทานเข้าไปในร่างกาย จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยกรดในกระเพาะอาหารและแบคทีเรียในลำไส้ได้เป็นสารประกอบที่ปราศจากน้ำตาลในโมเลกุล ที่เรียกว่าสารกลุ่มอะกลัยโคน ได้แก่ เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน

โดยมีสัดส่วนของเจนิสเตอีน (เปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้น คือเจนิสติน) เป็นปริมาณสูงสุด พบว่าถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเจนิสตินประมาณ 330 ถึง 2000 มิลลิกรัม (Wang and Murphy, 1994) ปริมาณของเจนิสเตอีนในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักและไม่ผ่านกระบวนการหมักจะมีไม่เท่ากัน โดยมีรายงานว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักจะมีปริมาณสารไอโซฟลาโวนในกลุ่มกลัยโคไซด์ (เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน) ในปริมาณที่มากกว่า ในทางตรงกันข้ามหากนำถั่วเหลืองมาผ่านการหมัก ก็จะทำให้ได้สารไอโซฟลาโวนในกลุ่มอะกลัยโคน (เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน) ในปริมาณที่มากกว่า (Coward et al., 1993; Wang and Murphy, 1994) มีรายงานว่าสารในกลุ่มอะกลัยโคนจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีกว่าสารในกลุ่มกลัยโคไซด์ โดยเจนิสเตอีนจัดเป็นสารไอโซฟลาโวนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งในการเจริญของเซลล์มะเร็งดีที่สุด มีรายงานว่าเจนิสเตอีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเจนิสตินในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ยังพบรายงานว่า ผู้ที่บริโภคอาหารที่ประกอบด้วยถั่วเหลือง จะลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านม ต่อมลูกหมาก และกระเพาะอาหารได้ และยังมีรายงานว่าชาวญี่ปุ่นและประชาชนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอัตราในการเป็นมะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเต้านม ต่ำกว่าชาวอเมริกันซึ่งบริโภคถั่วเหลืองน้อยกว่า (Adlercreutz, 1995) กลไกในการที่สารไอโซฟลาโวนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้นั้น อาจเนื่องมาจากการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โปรตีนจากถั่วเหลืองและเจนิสเตอีนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase และ topoisomerase I, II ซึ่งจำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ไอโซฟลาโวนยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ตับหนู เช่น cytochrome P450 ชนิด 3A, quinone reductase และ glutathione-s-transferase เป็นต้น ถั่วเหลืองทำให้ผนังเซลล์มีความคงตัว และลดการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์ตับ ผลเหล่านี้อาจเป็นกลไกที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งตับ



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของไอโซฟลาโวนกลุ่มอะกลัยโคน (เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน) และกลุ่มกลัยโคไซด์ (เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน)

สารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ กลัยโคไซด์ และอะกลัยโคน โดยกลัยโคไซด์คือสารในรูปอะกลัยโคนที่มีหมู่น้ำตาลกลูโคสมาเกาะอยู่ โครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มและแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยอนุพันธ์ 4 แบบ คือ อนุพันธ์อะกลัยโคน ได้แก่ เจนิสเตอีน เดดเซอีน และไกลซิเตอีน อนุพันธ์กลัยโคไซด์ ได้แก่ เจนิสติน เดดซีน และ ไกลซิติน อนุพันธ์มาโลนิล ได้แก่ 6”-O-malonyldaidzin, 6”-O-malonylgenistin, 6”-O-malonylglycitin และอนุพันธ์อะเซทิล ได้แก่ 6”-O-acetyldaidzin, 6”-O-acetylgenistin และ 6”-O-acetylglycitin โดยพบว่าพันธะที่ทำการเชื่อมต่อระหว่างส่วนอะกลัยโคนกับน้ำตาลคือ พันธะกลัยโคซิดิค ไอโซฟลาโวนในธรรมชาติจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ในสัดส่วนที่มากกว่าอะกลัยโคน โดยอยู่ในรูปอนุพันธ์มาโลนิลมากที่สุด (Kudou, 1991) เนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน สารเหล่านี้จึงสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

สารไอโซฟลาโวนสามารถถูกดูดซึมได้ดีในรูปอะกลัยโคน อย่างไรก็ตามไอโซฟลาโวนในธรรมชาติจะอยู่ในรูป กลัยโคไซด์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารดังกล่าวมีข้อจำกัดในการดูดซึมเนื่องจากข้อจำกัดของโครงสร้าง

ทางเคมี พบว่าสารไอโซฟลาโวนในรูปกลัยโคไซด์จะถูกดูดซึมได้ช้า และต้องอาศัยกระบวนการเมตาบอลิสมเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปที่สามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ต่อไป (Imizu, 2000; Kenneth, 2002) พบว่าหากต้องการเพิ่มอัตราการดูดซึมสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง อาจทำได้โดยการเปลี่ยนไอโซฟลาโวนให้อยู่ในรูปอะกลัยโคน ทั้งนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนการเกิดไฮโดรไลซิสในร่างกายอีกด้วย

งานวิจัยนี้มุ่งค้นคว้าหาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสำคัญกลัยโคไซด์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการสกัดสารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองให้อยู่ในรูปสารสกัดอะกลัยโคนปริมาณสูง เพื่อให้สารสำคัญไอโซฟลาโวนอยู่ในรูปที่พร้อมดูดซึมและออกฤทธิ์เพื่อพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ต่อไป งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงระยะเวลาในการแช่น้ำและอุณหภูมิการแช่น้ำต่อปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสตินในถั่วเหลือง เพื่อหาแนวทางในการกำหนดสภาวะการสกัด โดยมุ่งเน้นการปรับเปลี่ยนสารสำคัญในถั่วเหลืองให้อยู่ในรูปอะกลัยโคนให้มากที่สุด เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำข้อมูลไปปรับใช้ในการสกัดถั่วเหลืองในระดับการผลิตอะกลัยโคนเชิงอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้สารพร้อมออกฤทธิ์ในปริมาณสูง มีความปลอดภัยในการนำไปใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน และค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการผลิตต่ำ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 ถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.

1.2 สารมาตรฐาน ได้แก่ เจนิสติน เจนิสเตอีน เดดซีน และเดดเซอีน จากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

1.3 สารเคมี ได้แก่ Methanol (HPLC grade), Acetonitrile (HPLC grade), conc. hydrochloric acid (reagent grade), Hexane (reagent grade), Phosphoric acid (HPLC grade) จากบริษัท Fisher scientific Co.

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1 สารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีน

ละลายสารมาตรฐานเจนิสเตอีน 3.2 mg ใน 80% เมทานอลจำนวน 10 ml สารละลายที่ได้ใช้เป็น stock solution ที่มีความเข้มข้น 320 μg/ml จากนั้นนำ stock solution มาเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.8 μg/ml ถึง 24 μg/ml

2.1.2 สารละลายมาตรฐานเจนิสติน

ละลายสารมาตรฐานเจนิสติน 3.2 mg ใน 80% เมทานอลจำนวน 10 ml สารละลายที่ได้ใช้เป็น stock solution ที่มีความเข้มข้น 320 μg/ml จากนั้นนำ stock solution มาเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 8 μg/ml ถึง 320 μg/ml

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC

2.2.1 ระบบ High performance liquid chromatography

ระบบ HPLC ที่ใช้ในการทดลอง คือ Shimadzu LC-10 Series ควบคุมด้วย binary gradient pump LC-10AD ประกอบด้วย 100 μl injection loop, autosampler SIL-10A, Degasser DGU-14A, Autoinjector SIL-10AD, UV-Vis spectrometric detector SPD-10A, และ System controller SCL-10A คอลัมน์ HPLC คือ Reversed phase C18 รุ่น Water Symmetry® อนุภาค 5 μm ขนาดคอลัมน์ 3.9 x 150 mm I.D. ระบบการวิเคราะห์เป็นแบบ gradient โดยมี mobile phase A: 0.1% Phosphoric acid solution และ mobile phase B: Acetonitrile โดยมี conditions ดังนี้ 0-3 นาที (90% A) 3-43 นาที (90% A to 65% A) อัตราการไหล: 1 ml/min ปริมาตรฉีด: 20 μl ตรวจวัดด้วยระบบ ultraviolet spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 255 nm

2.2.2 การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบ retention time ของสารเจนิสเตอีนกับสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนชนิดอื่นๆ ที่พบในสารสกัดถั่วเหลือง โดยการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนชนิดต่างๆ รวมทั้งมีการฉีด

สารสกัดถั่วเหลือง เพื่อตรวจสอบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สามารถแยกสารที่เราต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่นๆ ในสารสกัดได้

2.2.3 การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัด

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วทำการลดความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนลงไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่วิธีการวิเคราะห์ยังสามารถตรวจพบได้ จากนั้นนำความเข้มข้นสุดท้ายที่วัดได้ (ปรากฏพีกบนโครมาโตแกรม) ฉีดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์และเครื่องตรวจวัดที่ใช้ยังสามารถพบพีกอยู่หรือไม่ ความเข้มข้นสุดท้ายที่วัดได้คือขีดจำกัดในการตรวจวัด

2.2.4 การตรวจสอบขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

ทดสอบสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าความถูกต้อง และค่าความแม่นยำ

2.2.5 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและเจนิสตินในช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ระดับความเข้มข้นสูง กลางและต่ำ โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ทำการทดสอบสารมาตรฐานเจนิสเตอีนในช่วงความเข้มข้น 0.8 μg/ml ถึง 24 μg/ml และทำการทดสอบสารมาตรฐานเจนิสตินในช่วงความเข้มข้น 8 μg/ml ถึง 320 μg/ml จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีกมาพล็อตกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นและหาค่า correlation coefficient (R^2)

2.2.6 การตรวจสอบความความถูกต้องภายในวันเดียวและความถูกต้องระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์

2.2.6.1 สารมาตรฐานเจนิสเตอีน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.8, 3.2, 13 และ 24 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความถูกต้องภายในวันเดียวและค่าความถูกต้องระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ โดยจะรายงานในรูปร้อยละการคืนกลับ

2.2.6.2 สารมาตรฐานเจนิสติน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสตินที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 16, 128, 160 และ 256 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความถูกต้องภายในวันเดียวและค่าความถูกต้องระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ โดยจะรายงานในรูปร้อยละการคืนกลับ

2.2.7 การตรวจสอบความความแม่นยำภายในวันเดียวและความแม่นยำระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์

2.2.7.1 สารมาตรฐานเจนิสเตอีน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสเตอีนที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.8, 3.2, 13 และ 24 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความแม่นยำภายในวันเดียวและค่าความแม่นยำระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ โดยจะรายงานในรูปของ %Relative Standard Deviation (%RSD)

2.2.7.2 สารมาตรฐานเจนิสติน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเจนิสตินที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 16, 128, 160 และ 256 μg/mL ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง โดยทำวิธีเดียวกันซ้ำ 3 วันติดต่อกัน นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าความแม่นยำภายในวันเดียวและค่าความแม่นยำระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ โดยจะรายงานในรูปของ %Relative Standard Deviation

2.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเจนิสตินและเจนิสเตอีน

วัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ 6

ระดับความเข้มข้น และทำการทดลองซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นนำพื้นที่ใต้พีกของแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้น และแกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้พีก คำนวณหาสมการความสัมพันธ์ของค่า X และ Y

2.4 การศึกษาปัจจัยด้านระยะเวลาในการแช่น้ำต่อปริมาณสารสำคัญ

ชั่งถั่วเหลืองแห้งมาตัวอย่างละ 1 กรัม จำนวน 6 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างจะถูกแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 ˚C) ด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดรินน้ำออกให้หมด นำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท บดถั่วเหลืองที่แห้งแล้วให้ละเอียด สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) นำแต่ละตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 80% เมทานอล เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองเอาส่วนใส สกัดกากที่ได้ซ้ำด้วย 80% เมทานอล อีก 2 ครั้ง แล้วรวมสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร โดยการระเหยตัวทำละลายออกจนได้ปริมาตรสุดท้าย นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัดโดยวิธี HPLC โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

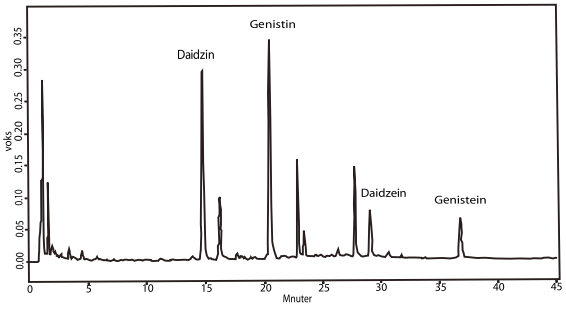
2.5 การศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิในการแช่น้ำต่อปริมาณสารสำคัญ

ชั่งถั่วเหลืองแห้งมาตัวอย่างละ 1 กรัม แต่ละตัวอย่างจะถูกแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60 ˚C ด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด รินน้ำออกให้หมด นำมาผึ่งบนถาดสะอาด วางในตู้ดูดอากาศจนถั่วเหลืองแห้งสนิท บดถั่วเหลืองที่แห้งแล้วให้ละเอียด สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทเฮกเซนทิ้ง แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดอากาศ (ได้ defatted soybean) นำแต่ละตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 80% เมทานอล เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองเอาส่วนใส สกัดกากที่ได้ซ้ำด้วย 80% เมทานอล อีก 2 ครั้ง แล้วรวมสารละลายใสที่ผ่านการกรองแล้วเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร โดยการระเหยตัวทำละลายออกจนได้ปริมาตรสุดท้าย นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาส่วนประกอบของไอโซฟลาโวนในสารสกัด ด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น จะได้การแยกที่สมบูรณ์ของสารมาตรฐานเจนิสเตอีนและเจนิสตินโดย retention time ของเจนิสเตอีน เดดเซอีน เจนิสติน และ เดดซิน มีค่าประมาณ 36.86, 29.21, 20.68, และ 15.37 นาที ตามลำดับ และพบว่าสารสำคัญไอโซฟลาโวนในสารสกัดถั่วเหลืองสามารถแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดถั่วเหลือง (mobile phase A: 0.1% Phosphoric acid solution และ mobile phase B: Acetonitrile โดยมี conditions ดังนี้ 0-3 นาที (90% A) 3-43 นาที (90% A - 65% A) อัตราการไหล: 1 ml/min ปริมาตรฉีด: 20 µl ตรวจวัดด้วยระบบ ultraviolet spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 255 nm)

ความเข้มข้นของเจนิสเตอีนที่ต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวยังสามารถแยกสารเจนิสเตอีนออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆ คือ 0.1 ug/ml และเมื่อลดความเข้มข้นต่ำลงจะไม่ปรากฏพีกบนโครมาโตแกรม และขีดจำกัด

ของการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีนี้ คือ 0.3 µg/mL โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าค่าความถูกต้องที่แสดงในรูปร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 88.47 ถึง 92.63 และค่าความแม่นยำที่แสดงในรูป %RSD มีค่าเท่ากับ 1.74% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตารางสรุปค่าการตรวจสอบความถูกต้องและน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเจนิสเตอีนและเจนิสติน

Parameters	สารมาตรฐาน	
	เจนิสเตอีน	เจนิสติน
ความจำเพาะเจาะจง	มี	มี
ขีดจำกัดของการตรวจวัด	0.1 µg/mL	0.2 µg/mL
ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ	0.3 µg/mL	0.7 µg/mL
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง		
● Linear equation	y = 14155x +25513	y = 7615.6x +36445
● Correlation coefficient (R^2)	0.9990	0.9992
ความถูกต้อง (%Recovery)		
● Intra-day	95.72	103.03
● Inter-day	96.42-101.74	98.02-112.84
ความแม่นยำ (%RSD)		
● Intra-day	1.36	1.71
● Inter-day	0.74-4.39	0.24-2.78

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ทำได้โดยวิเคราะห์หาความถูกต้อง 2 วิธี คือ ความถูกต้องภายในวันเดียวและความถูกต้องระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แสดงผลในรูปร้อยละการคืนกลับ ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน ในช่วงความเข้มข้น 0.8-24 µg/ml และความเข้มข้น 16-256 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1

ในการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ ทำได้โดยวิเคราะห์หาความแม่นยำ 2 วิธี คือ ความแม่นยำภายในวันเดียวและความแม่นยำระหว่างวันเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน แสดงผลในรูป %Relative Standard Deviation (%RSD) ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน ในช่วงความเข้มข้น 0.8-24 µg/ml และความเข้มข้น 16-256 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเจนิสตินและเจนิสเตอีน

จากการทดลองพบความสัมพันธ์เชิงเส้นของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสเตอีน ในช่วงความเข้มข้น 0.8-24 µg/ml โดยมีค่า R^2 = 0.9990 และพบความสัมพันธ์เชิงเส้นของพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเจนิสตินในช่วงความเข้มข้น 8-256 µg/ml โดยมีค่า R^2 = 0.9992

ตารางที่ 2 แสดงค่าสมการและค่า correlation coefficient (R^2) ของกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน (n=3)	สมการ	R^2
เจนิสเตอีน	y = 14155.0x +25513	0.9990
เจนิสติน	y = 7615.6x +36445	0.9992

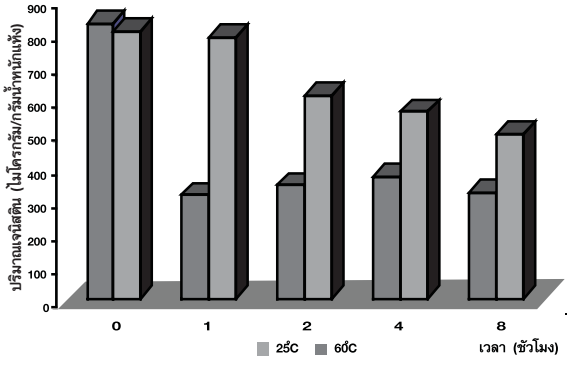
3. ปัจจัยด้านระยะเวลาในการแช่น้ำและอุณหภูมิของการแช่น้ำต่อปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสตินในถั่วเหลือง

ตารางที่ 3 แสดงผลของระยะเวลาการแช่น้ำและอุณหภูมิของการแช่น้ำต่อปริมาณสารเจนิสเตอีนและเจนิสติน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) ในสารสกัดถั่วเหลือง พบว่าปริมาณของเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำ ปริมาณที่เพิ่มขึ้นคิดเป็น 80.49 ไมโครกรัม/กรัม หลังจากแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ˚C และคิดเป็น 135.81 ไมโครกรัม/กรัม หลังจากแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 ˚C ในขณะที่ปริมาณของเจนิสตินจะลดลงตามระยะเวลาการแช่ในทั้ง 2 ช่วงอุณหภูมิ ปริมาณของเจนิสตินลดลง 309.65 ไมโครกรัม/กรัม และ 505.94 ไมโครกรัม/กรัม หลังการแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ˚C และ 60 ˚C ตามลำดับ เมื่อแช่น้ำเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าถั่วเหลืองมีลักษณะเปื่อยยุ่ยและไม่สามารถนำมาทำให้แห้งและสกัดสารสำคัญต่อได้

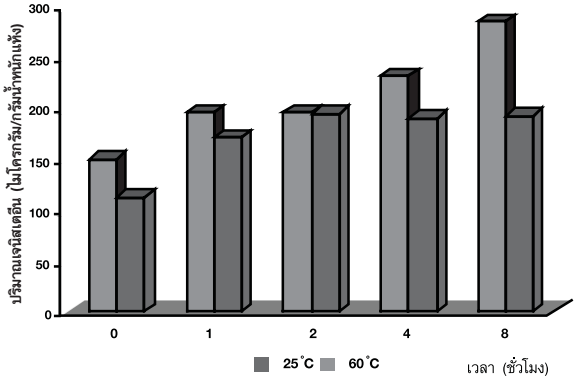
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารเจนิสเตอีน และเจนิสตินในสารสกัดถั่วเหลือง (n =3) เมื่อผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 25˚C และ 60˚C ตามช่วงเวลาต่างๆ

ระยะเวลาที่แช่น้ำ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ 25˚C		อุณหภูมิ 60˚C	
	เจนิสติน (μg/g dry weight)	เจนิสเตอีน (μg/g dry weight)	เจนิสติน (μg/g dry weight)	เจนิสเตอีน (μg/g dry weight)
0	803.46 ± 2.59	112.50 ± 3.96	826.99 ± 3.96	150.46 ± 0.17
1	787.25 ± 3.84	172.32 ± 5.95	311.42 ± 3.44	195.92 ± 4.81
2	611.91 ± 3.80	195.08 ± 5.14	340.48 ± 4.67	196.16 ± 0.91
4	561.28 ± 7.07	190.87 ± 3.29	367.30 ± 3.97	231.13 ± 1.67
8	493.81 ± 2.15	192.99 ± 4.74	321.05 ± 2.53	286.27 ± 5.06
24	N/D*	N/D*	N/D*	N/D*

***Not detectable** การแช่ถั่วเหลืองไว้ข้ามคืน ทำให้เกิดการเปื่อยยุ่ยของเมล็ดถั่วเหลือง ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญต่อได้



รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารเจนิสตินในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 25˚C และ 60˚C



รูปที่ 4 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารเจนิสเตอีนในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 25˚C และ 60˚C

อภิปรายผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความถูกต้องแม่นยำ และสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารเจนิสเตอีนและเจนิสตินได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆ ในตัวอย่าง

ปริมาณของเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของระยะเวลาการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 25˚C เป็นผลมาจากการเกิดไฮโดรไลซิสของสารเจนิสตินและอนุพันธ์ (มาโลนิลเจนิสตินและอะเซทิลเจนิสติน) โดยการทำงานของเอนไซม์ β-glycosidase ที่เปลือกด้านในของถั่วเหลืองซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 ˚C ถึง 45 ˚C (Matsuura and Obata, 1993; Wang and Murphy, 1996; Kao et al., 2004) ณ อุณหภูมิดังกล่าวคาดว่าการที่ปริมาณเจนิสเตอีนไม่เพิ่มขึ้นอีกเกิดจากการอิ่มตัวจากการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าปริมาณสารเจนิสตินลดลงตามลำดับตามระยะเวลาการแช่น้ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ β-glycosidase ในการทำลายพันธะกลัยโคซิดิคเพื่อตัดหมู่น้ำตาลออกจากโมเลกุล และอาจเกิดจากการสูญเสียสารเจนิสตินไปบางส่วนกับการแช่น้ำเนื่องจากสารกลุ่มกลัยโคไซด์นี้สามารถละลายน้ำได้ดี พบว่าการลดลงของเจนิสตินและการเพิ่มขึ้นของเจนิสเตอีนจะเป็นสัดส่วนกันหลังจากการแช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง คาดว่าการสูญเสียกลัยโคไซด์ไปกับน้ำจะมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการแช่น้ำยาวนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่าระยะเวลาการแช่น้ำที่นานจะก่อให้เกิดการสูญเสียอนุพันธ์กลัยโคไซด์ไปในปริมาณมาก (Jackson et al., 2002; Simonne et al., 2000)

ที่อุณหภูมิ 60 ˚C ปริมาณของเจนิสเตอีนเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามระยะเวลาการแช่น้ำ เป็นผลมาจากความร้อนไปทำลายพันธะกลัยโคซิดิค มีรายงานว่าเอนไซม์ β-glycosidase จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 ˚C (Matsuura et al., 1995; Pandjaitan et al., 2000) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะกลัยโคนจึงไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าการที่ปริมาณสารเจนิสตินลดลงอย่างรวดเร็วใน 1 ชั่วโมงแรกของการแช่น้ำ น่าจะเป็นผลจากความร้อนที่มีต่อพันธะกลัยโคซิดิค ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยว่าความร้อนสามารถทำลายสารประกอบกลัยโคไซด์ในถั่วเหลืองและทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองลดลง (Chien, 2005) หลังจากชั่วโมงแรกของการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60 ˚C ไม่พบการลดลงของสารเจนิสตินอีก ในขณะที่ปริมาณสารเจนิสเตอีนยังคงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำ ทั้งนี้น่าจะเกิดจากการสลายตัวของอนุพันธ์มาโลนิลเจนิสตินโดยความร้อนไปเป็นสารเจนิสตินและเจนิสเตอีนตามลำดับ (Chien, 2005)

จากการทดลองพบว่าการแช่ถั่วเหลืองที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 ˚C จะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอะกลัยโคนโดยอาศัยกลไกการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยความร้อน ไม่ได้อาศัยเอนไซม์ที่เปลือกของถั่วเหลือง พบว่าปัจจัยด้านอุณหภูมิการแช่น้ำมีผลต่อปริมาณอะกลัยโคนมากกว่าปัจจัยด้านระยะเวลาการ

แช่น้ำ อย่างไรก็ตามอาจเกิดการสูญเสียกลัยโคไซด์ไปกับน้ำเมื่อระยะเวลาการแช่น้ำยาวนานขึ้น พบว่าการแช่น้ำที่ 60 ˚C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นสภาวะเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการสกัดสารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองให้อยู่ในรูปสารสกัดอะกลัยโคนปริมาณสูง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้อยู่ภายใต้ชุดโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

Adlercreutz H, Goldin BR, Gorbach SL. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125: 757S-770S.

Chien JT, Hsieh HC, Kao TH, et al. 2005. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chem* 91: 425-434.

Coward L, Barnes NC, Setchell KD, et al. 1993. Genistein, daidzein and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.

Coward L, Smith M, Kirk M, et al. 1998. Chemical modification of isoflavone in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* 68: 1486-91.

Imizu T, Piskula MK, Osawa S, et al. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130: 1695-99.

Jackson C, Dini JP, Lavandier C, et al. 2002. Effect of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Proc Biochem* 37: 1117-1123.

Kao TH, Lu YF, Hsieh HC, et al. 2004. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Res Int* 37: 891-900.

Kenneth DRS, Nadine MB, Kinda ZN, et al. 2002. Evedence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in human, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76: 447-53.

Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (Glycine max Merrill). *Agri Biol Chem* 155: 2227-2233.

Matsuura M, Obata A. 1993. β-glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J Food Sci* 58: 144-147.

Matsuura M, Sasaki J, Murao S. 1995. Studies on β-glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and character-ization of an isozyme. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1623-1327.

Pandjaitan N, Hettiarachy N, Ju ZY. 2000. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with β-glucosidases. *J Food Sci* 65: 401-407.

Simonne AH, Smith M, Weaver DB, et al. 2000. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. *J Agric Food Chem* 48: 6061-6069.

Walter ED. 1941. Genistin (an isflavone glucoside) and its aglycone, genistin, from soybeans. *J Am Chem Soc* 63: 3273- 6.

Wang H, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42: 1666-1673.

Wang H, Murphy PA. 1996. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. foods. *J Agric Food Chem* 44: 2377-2383.